

· 论著 ·

复方首乌藤合剂的薄层鉴别和总黄酮的含量测定

曾棋平, 曹毅祥, 黄丽珊, 张 荣 (解放军 175 医院制剂科, 福建 漳州 363000)

[摘要] **目的** 建立复方首乌藤合剂的质控方法。**方法** 采用薄层色谱法对合剂中的首乌藤、合欢皮和五味子进行定性鉴别。以芦丁为对照品, 采用紫外分光光度法测定总黄酮含量。**结果** 各供试品色谱中, 在与对照品及对照药材色谱相应的位置上显相同颜色斑点, 色谱清晰, 附近无杂质斑点干扰。芦丁在 9.12~27.36 $\mu\text{g/ml}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系, 线性回归方程为 $A = 0.03455C - 0.11034$ ($r = 0.9992$), 平均加样回收率为 101.0% (RSD=1.58%)。**结论** 该方法操作简便、快速、有效、灵敏、准确、重现性好、专属性强, 可作为复方首乌藤合剂的质量控制方法。

[关键词] 复方首乌藤合剂; 薄层色谱法; 总黄酮; 紫外分光光度法; 含量

[中图分类号] R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2016)05-0424-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2016.05.011

TLC identification and determination of total flavonoids in Compound caulis Polygoni multiflori mixture

ZENG Qiping, CAO Yixiang, HUANG Lishan, ZHANG Rong (The Pharmacy Department, No. 175 Hospital of PLA, Zhanzhou 363000, China)

[Abstract] **Objective** To establish the quality control standards for Compound caulis Polygoni multiflori mixture. **Methods** Caulis polygoni multiflori, cortex alibiziae and schisand chinensis were identified by TLC, total flavonoids were determined by UV. **Results** Caulis polygoni multiflori, cortex alibiziae and schisand chinensis could be detected by TLC. A better linear relationship between concentration and absorbance in the range of 9.12~27.36 $\mu\text{g/ml}$. The linear regression equation was $A = 0.03455C - 0.11034$ ($r = 0.9992$), The average recovery of emodin was 101.0% (RSD=1.58%). **Conclusion** The method is simple, quick, accurate and sensitive, which could be used as a quantitative analysis method for this preparation.

[Key words] Compound caulis Polygoni multiflori mixture; TLC; total flavonoids; ultraviolet spectrophotometry; content

复方首乌藤合剂是我院制剂科自行研制的协定处方制剂。主要由首乌藤、合欢皮、川芎、续断、五味子等 8 味药材组成。方中首乌藤味甘, 养血安神, 为君药。合欢皮解郁安神, 乃悦心安神之要药, 为臣药, 君臣相伍, 五脏安和, 心志欢悦, 以收养心安神解郁之效。临床上用于神经衰弱性失眠、眩晕及脑外伤引起的头痛、头晕等疾病的治疗, 疗效显著^[1,2]。黄酮类化合物是复方首乌藤合剂中一种重要的有效成分, 研究表明, 黄酮类化合物能降低血压和脑血管阻力, 能有效改善头痛、头晕等症状^[3], 刘一明等^[4]报道, 黄酮类成分可以显著降低正常小鼠脑内 5-HT、NA 水平、提高 GABA 水平的趋势, 可有效缩短睡眠潜伏期, 延长睡眠持续时间。为了提高复方

首乌藤合剂质量的可控性, 笔者对药材首乌藤、合欢皮、川芎、五味子进行了薄层鉴别, 并以总黄酮为指标, 采用紫外分光光度法建立了含量测定方法, 为质量控制提供依据。

1 仪器与材料

752 型紫外光栅分光光度计(上海第三分析仪器厂), AUX220 型电子分析天平(精度: 0.1 mg, 日本-岛津), 紫外可见分光光度计(2550, 岛津-苏州), 低速离心机(LD5-2A, 北京医用离心机厂), 数显恒温水浴锅(HH2, 江苏金坛市江南仪器厂), 华美冷柜(SY-176, 杭州华美电冰箱厂)。

高效硅胶 G 薄层板、硅胶 H 薄层板、硅胶 GF₂₅₄ 薄层板(青岛海洋化工厂分厂)。

大黄素对照品(批号: 110756-200110, 含量 98.0%)、首乌藤对照药材(1939-9202)、五味子对照药材(0922-9803)、川芎对照药材(0918-200004)、合欢皮对照药材(121549-201002)、芦丁对照品(批号:

[作者简介] 曾棋平, 硕士, 药师。研究方向: 药物制剂配制与分析。Tel: (0596)2925740; E-mail: 850705020@qq.com

[通讯作者] 张 荣, 副主任药师。研究方向: 医院制剂、药物分析及天然活性产物研究。E-mail: Lianfamily175@126.com

100080-200707, 含量 98.0%) 均购于中国食品药品检定研究院, 复方首乌藤合剂(本院自制, 批号: 20140902, 20141009, 20141028, 规格: 40 ml), 磷钼酸、乙醇、三氯化铝、氢氧化钠、醋酸钠等试剂均为分析纯, 水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 薄层鉴别

2.1.1 首乌藤的鉴别 取复方首乌藤合剂 20 ml, 用水饱和的正丁醇萃取(20 ml×3), 合并正丁醇液, 水浴蒸干, 残渣加 3 ml 乙醇使其溶解, 作为供试品溶液。另取缺首乌藤的阴性对照样品同法制成阴性对照溶液。取 0.5 g 首乌藤对照药材, 加 50 ml 乙醇, 加热回流 1 h, 过滤, 滤液浓缩至 3 ml 作为对照药材溶液。再取大黄素对照品, 加乙醇制成 1 mg/ml 的对照品溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2010 年版一部附录 VI B) 试验, 吸取上述 4 种溶液各 5 μl 分别点于同一硅胶 H 薄层板上, 以石油醚(30~60 °C)-甲酸乙酯-甲酸(15:5:1) 的上层溶液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(365 nm) 下检视, 结果见图 1。供试品色谱中, 在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显示相同颜色的荧光斑点。

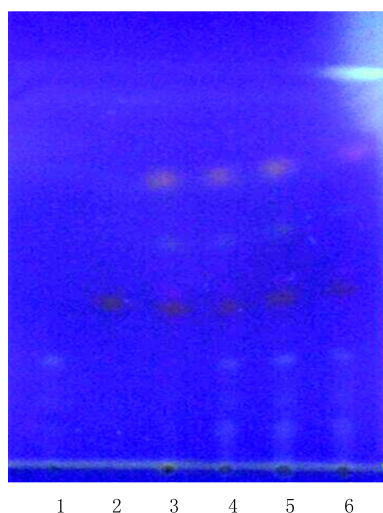


图 1 首乌藤的 TLC 鉴别

1. 缺首乌藤阴性对照品; 2. 大黄素对照品; 3. 首乌藤对照药材;
4. 供试品 20140902; 5. 供试品 20141009; 6. 供试品 20141028

2.1.2 合欢皮的鉴别 取复方首乌藤合剂 20 ml, 用水饱和的正丁醇提取 2 次, 每次 20 ml, 合并正丁醇液, 残渣加甲醇 0.5 ml 使其溶解, 作为供试品溶液。另取缺首乌藤的阴性对照样品同法制成阴性对照溶液。取合欢皮对照药材 1 g, 加 50% 甲醇 10 ml 浸泡 1 h, 超声处理 30 min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加

水 5 ml 使溶解, 正丁醇振摇提取 2 次, 每次 5 ml, 合并正丁醇溶液, 蒸干, 残渣加甲醇溶解制备成对照药材溶液。精密吸取阴性对照溶液、供试品溶液、对照品溶液各 5 μl 点于同一高效硅胶 G 薄层板上, 以三氯甲烷-甲醇-水(13:5:2) 的下层溶液为展开剂(每 10 ml 添加 0.1 ml 甲酸), 展开, 取出, 晾干, 喷以 5% 磷钼酸乙醇溶液, 在 105 °C 加热至斑点显示清晰, 结果见图 2。在与对照药材色谱相应的位置上, 显示相同颜色的荧光斑点。

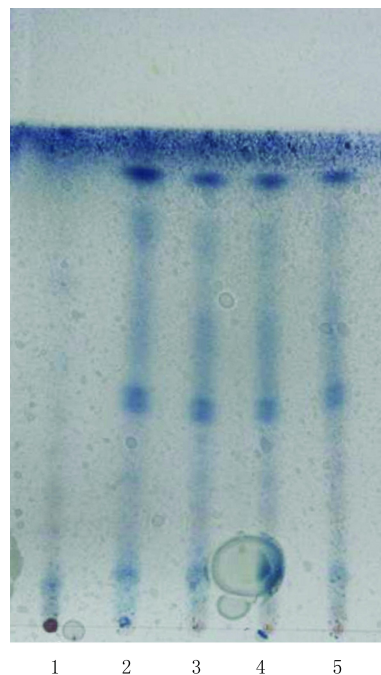


图 2 合欢皮的 TLC 鉴别

1. 缺合欢皮阴性对照品; 2. 合欢皮对照药材; 3. 供试品
20140902; 4. 供试品 20141009; 5. 供试品 20141028

2.1.3 川芎的鉴别 取本品 20 ml, 用乙醚振摇提取 2 次, 每次 20 ml, 合并乙醚液, 蒸干, 残渣加 2 ml 乙酸乙酯使溶解, 作为供试品溶液。另取缺川芎的阴性样品同法制成阴性对照溶液。再取川芎对照药材粉末 1 g, 加乙醚 20 ml, 加热回流 1 h, 过滤, 滤液挥干, 残渣加乙酸乙酯 2 ml 使溶解, 作为对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典 2010 年版一部》附录 VI B) 试验, 吸取上述 3 种溶液各 5 μl, 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以正己烷-乙酸乙酯(9:1) 为展开剂, 置预饱和 15 min 展开缸内, 展开, 取出, 晾干, 置紫外灯(365 nm) 下检视, 结果见图 3。在与对照药材色谱相应的位置上, 显亮蓝色的荧光斑点, 阴性对照溶液无干扰。

2.1.4 五味子的鉴别 取本品 40 ml, 用石油醚(60~90 °C) 振摇提取 2 次, 每次 40 ml, 合并石油醚液, 蒸干, 残渣加二氯甲烷 1 ml 使溶解, 作为供试品

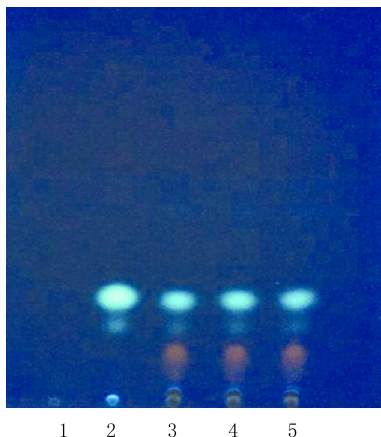


图3 川芎的TLC鉴别

1. 缺川芎阴性对照品; 2. 川芎对照药材; 3. 供试品 20140902; 4. 供试品 20141009; 5. 供试品 20141028

溶液。另取缺五味子的阴性样品同法制成阴性对照溶液。再取五味子对照药材粉末1g,加二氯甲烷40ml,加热回流30min,滤过,滤液蒸干,残渣加二氯甲烷1ml使溶解,作为对照药材溶液。照薄层色谱法(《中国药典2010年版一部》附录VI B)试验,吸取上述3种溶液各10 μ l,分别点于同一硅胶GF₂₅₄薄层板上,以环己烷-乙酸乙酯-甲酸(5:3:0.05)为展开剂,展开,取出,晾干,置紫外灯(254nm)下检视,结果见图4。供试品色谱中,在与对照药材色谱相应的位置上,显相同颜色的斑点,阴性对照溶液无干扰。

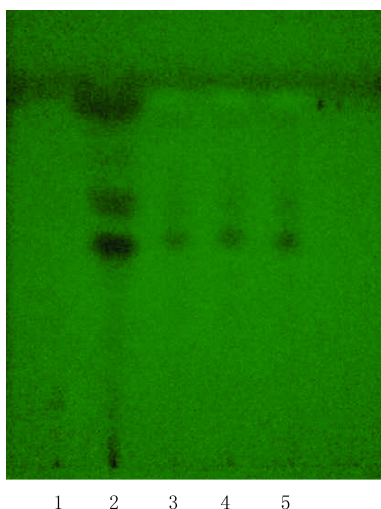


图4 五味子的TLC鉴别

1. 缺五味子阴性对照品; 2. 五味子对照药材; 3. 供试品 20140902; 4. 供试品 20141009; 5. 供试品 20141028

2.2 总黄酮含量的测定

2.2.1 对照品溶液的制备 取干燥至恒重的芦丁对照品约10mg,精密称定,置50ml量瓶中,加60%乙醇适量,于80 $^{\circ}$ C水浴中加热使溶解,放冷,加

60%乙醇稀释至刻度,摇匀,配制成0.2mg/ml的对照品溶液,备用。

2.2.2 供试品溶液的制备 取复方首乌藤合剂40ml,4500r/min离心15min,精密量取上清液20ml,置100ml烧杯中,搅拌下加无水乙醇使含醇量达60%,冷藏24h后取出,4500r/min离心15min,倾取上清液。沉淀续以60%乙醇适量,搅拌5min,再离心15min,倾取上清液。合并上清液,转移至100ml量瓶中,加60%乙醇稀释至刻度,摇匀,精密吸取1ml溶液于10ml量瓶中,加60%乙醇稀释至刻度,即得供试品溶液,备用。

2.2.3 最大吸收波长的测定 查阅相关文献,采用三氯化铝显色法测定^[4]。精密吸取对照品溶液和样品溶液各2.0ml,置25ml量瓶中,加0.1mol/L三氯化铝溶液3ml及1mol/L醋酸钠溶液5ml,加甲醇至刻度,摇匀,放置5min,以相应试剂为空白,在200~550nm范围内扫描光谱,结果见图5,结果显示对照品和供试品在273nm左右有最大吸收,因此选择273nm作为测定波长。

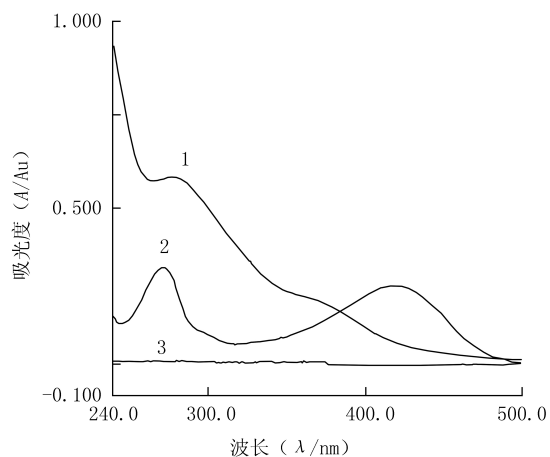


图5 最大吸收波长的测定

1. 供试品溶液; 2. 对照品溶液; 3. 空白溶液

2.2.4 标准曲线的制备 精密吸取芦丁对照品溶液1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0ml分别置25ml量瓶中,分别加0.1mol/L三氯化铝溶液3ml及1mol/L醋酸钠溶液5ml,加甲醇至刻度,摇匀,放置5min,以相应试剂为空白,在273nm波长处测定吸光度。以浓度为横坐标,吸光度为纵坐标。绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=0.03455X-0.11034$ ($r=0.9996$),结果表明,芦丁对照品在9.12~27.36 μ g/ml范围内呈良好的线性关系。

2.2.5 精密度试验 精密量取供试品溶液2ml,依“2.2.4”项下方法测定,连续6次,标准曲线法计

算总黄酮含量,以总黄酮含量计算 RSD ($n=6$),结果 RSD 为 1.03%,表明精密度高。

2.2.6 稳定性试验 精密量取供试品溶液 2 ml 置 25 ml 量瓶中,依“2.2.4”项下方法操作,在 60 min 内,每隔 10 min 测定一次吸光度,计算 RSD。结果 RSD 为 0.15%,表明复方首乌藤合剂在 60 min 内稳定性良好。

2.2.7 重复性试验 取供试品溶液 2 ml 共 6 份,依“2.2.4”项下方法操作,按标准曲线计算吸光度,计算 RSD,结果 6 份供试品溶液的 RSD 为 2.57%。

2.2.8 加样回收率试验 精密量取已知含量的供试品溶液 1 ml 共 6 份,每份精密加入芦丁对照品溶液。依“2.2.4”项下方法操作,计算总黄酮的平均加样回收率。

表 1 复方首乌藤合剂中总黄酮的加样回收率试验结果

取样量 (V/ml)	供试品含量 (m/mg)	加入量 (m/mg)	测得量 (m/mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1.0	0.010 5	0.010 5	0.021 0	100.0		
1.0	0.010 5	0.010 5	0.020 9	99.0		
1.0	0.010 5	0.010 5	0.021 1	101.0	101.0	1.58
1.0	0.010 5	0.010 5	0.021 0	100.0		
1.0	0.010 5	0.010 5	0.021 3	102.9		
1.0	0.010 5	0.010 5	0.021 3	102.9		

2.2.9 复方首乌藤合剂总黄酮含量测定 取首乌藤合剂 3 批(批号为:20140902,20141009,20141028),按“2.2”项下方法制备供试液,在 273 nm 波长处测定吸收度,按标准曲线法计算总黄酮含量。

表 2 3 批复方首乌藤合剂样品含量测定结果

批号	总黄酮含量 ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	平均含量 ($\mu\text{g}/\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)	RSD (%)
20140902	2.159	2.060	3.11
	2.020		
	2.027		
20141009	2.265	2.246	0.73
	2.239		
	2.235		
20141028	2.162	2.202	1.60
	2.216		
	2.228		

3 讨论

3.1 复方首乌藤合剂中君药首乌藤的主要成分为大黄素、2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷^[5],臣药合欢皮的主要成分为(-)-丁香树脂酚-4-O- β -D-呋喃芹糖基-(1 \rightarrow 2)- β -D-吡喃葡萄糖苷^[5],佐药菟丝子的主要成分为金丝桃苷,五味子的主要成分为五味子甲素。在前期研究中,已经采用 HPLC 测定了君药首乌藤的成分大黄素。由于合剂中各味药材均含有黄酮类成分^[6,7],为了更好地控制制剂的质量,将总黄酮的含量测定作为一项质量控制指标。

3.2 测定总黄酮含量时供试品经醇沉后分别经 5、10、20 倍稀释,在 273 nm 处测得吸光度值,通过对比发现 10 倍稀释后供试液的 A_{273} 落在 0.3~0.7 之间,确定稀释 10 倍为适宜的倍数。

3.3 采用 NaNO_2 - $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ - NaOH 比色法测定复方首乌藤合剂中总黄酮的含量时,供试液出现了絮凝状红色沉淀,这可能是由于提取液中含有的花色色素等杂质的干扰^[8,9],对吸光度的测定产生影响,使得测定结果不稳定。通过预实验发现三氯化铝显色法稳定性良好,故采用该法进行总黄酮含量的测定。

【参考文献】

- [1] 张 荣,王庆芬,田文君.等.复方首乌藤合剂中药材的鉴别和大黄素的测定[J]. 华西药理学杂志,2008,23(1):117-118.
- [2] 翟学佳,刘金梅,史 芳,等.健脑合剂的质量控制方法研究[J]. 华西药理学杂志,2012,31(4):483-485.
- [3] 熊恩庸,白雪峰.湘西产野葛不同部位中总黄酮及葛根素的含量测定[J]. 生物技术世界,2014,10(4):181-183.
- [4] 刘一鸣.九里香叶总黄酮及其单体镇静催眠作用的药理学研究[D]. 吉林:吉林大学,2014:39-44.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典 2010 年版一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:134,248.
- [6] 潘佳伟,闫 雨,尹 芹,等.表面活性剂辅助提取首乌藤中的总黄酮[J]. 生物加工过程,2014,12(3):32-36.
- [7] 朱晓南,宗利丽,张宸铭,等.菟丝子及其主要成分黄酮对肾虚排卵障碍大鼠的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(8):169-172.
- [8] 陈佩东,严 辉,丁安伟,等.不同产地蒲黄中总黄酮的含量测定[J]. 江西中医药,2007,39(6):55-56.
- [9] 刘江雏,周荣琪.竹叶提取物总黄酮含量测定方法的改进[J]. 食品科技,2005,7:76-79.

【收稿日期】 2015-02-05

【修回日期】 2015-08-02

【本文编辑】 顾文华